

学校编码: 10384  
学号: 32320131153392

分类号\_\_密级  
UDC

厦门大学

硕 士 学 位 论 文

**金线莲共生真菌次生代谢产物激活潜伏期  
HIV 病毒活性成分地发现及其机制研究**

**Bio-guide Screening of Latent HIV Activators from  
Secondary Metabolites in *Anoectochilus Roxburghii*  
Symbiotic Fungis and Exploration of The Mechanisms**

尤洪超

指导教师姓名: 周 强 教授  
专 业 名 称: 化学生物学  
论文提交日期: 2016 年 4 月  
论文答辩时间: 2016 年 5 月  
学位授予日期: 2016 年 5 月

答辩委员会主席:  
评阅人:

2016 年 5 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于        年        月        日解密，解密后适用上述授权。

（        ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年        月        日

# 目录

英文缩略词对照表.....	VI
摘要.....	VIII
Abstract .....	IX
第一章 前言.....	1
1.1 艾滋病病毒介绍.....	1
1.1.1 艾滋病病毒简介.....	1
1.1.2 艾滋病的致病机理以及潜伏库的形成.....	1
1.1.3 艾滋病治疗方法.....	2
1.1.4 艾滋病新疗法-“shock and kill” .....	3
1.2 植物共生真菌次生代谢产物中筛选 HIV 激活剂.....	4
1.3 金线莲及其共生真菌研究进展.....	5
1.4 真核生物基因转录调控.....	7
1.4.1 RNA 聚合酶.....	7
1.4.2 RNA 聚合酶 II 的循环磷酸化.....	7
1.4.3 正性转录延伸复合物 P-TEFb.....	9
1.5 钙离子信号通路与基因转录调控.....	10
1.5.1 细胞内钙离子信号系统.....	10
1.5.2 钙调磷酸酶.....	11
1.5.3 钙离子所涉及到的基因转录相关的信号通路.....	12
1.6 细胞凋亡.....	13
1.6.1 细胞凋亡特点及检测方法.....	13
1.6.2 细胞凋亡的分子机制.....	13
1.7 本研究的目的与意义.....	14
第二章 实验材料与方法.....	16
2.1 实验材料.....	16
2.1.1. 细胞株、菌株、质粒.....	16

2.1.2. 实验主要试剂.....	16
2.1.3. 主要仪器和耗材.....	17
2.1.4. 主要溶液配方.....	18
<b>2.2 实验方法.....</b>	<b>24</b>
2.2.1. 细胞培养.....	24
2.2.2 流式细胞仪分析.....	25
2.2.3. 荧光素酶 Luciferase 实验.....	26
2.2.4. 细胞瞬时转染（以六空板为例）.....	26
2.2.5. 细胞核抽提实验.....	27
2.2.6. 免疫共沉淀.....	28
2.2.7. 免疫印记实验（Western blot）.....	28
2.2.8. Total RNA 提取、反转录以及荧光定量 PCR（qRT-PCR）... ..	29
2.2.9. 染色体免疫共沉淀（CHIP）.....	31
2.2.10. 细胞周期检测.....	34
2.2.11. Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测.....	34
2.2.12. 质粒转化.....	35
2.2.13. 质粒提取.....	36
<b>第三章 结果与讨论.....</b>	<b>37</b>
3.1. 金线莲共生菌次生代谢产物中筛选 HIV 激活剂.....	37
3.2. ARL10-S8 激活潜伏期 HIV 病毒呈现出时间和浓度依赖性的特点.....	40
3.3. ARL10-S8 引起 7SK snRNP 解离，促进 SEC 复合物的组装 .....	41
3.4. ARL10-S8 引起的 HIV 病毒激活与钙离子信号相关，并由此引发了 7SK snRNP 复合物的解离 .....	43
3.5. ARL10-S8 激活钙调磷酸酶，引起 NFATs 响应，参与到潜伏期 HIV 病毒的激活过程中 .....	45
3.6. ARL10-S8 具有抗肿瘤活性.....	47
3.7. ARL10-S8 引起细胞周期阻滞并通过细胞色素 C 途径引起细胞凋亡 ...	48
3.8. 讨论 .....	49
3.9. 小结 .....	51

3.10. 展望 .....	51
参考文献 .....	53
致谢 .....	60

厦门大学博硕士论文摘要库

## Catalogue

<b>Abbreviation .....</b>	<b>VI</b>
<b>Abstract in Chinese.....</b>	<b>VIII</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>IX</b>
<b>Chapter I Forwords.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Introduction of AIDS .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Introduction of AIDS .....	1
1.1.2 The pathogenesis of AIDS and the formation of the latent reservoir.....	1
1.1.3 Therapy of AIDs .....	2
1.1.4 New therapy of AIDs-“shock and kill” .....	3
<b>1.2 Screening of HIV activator from plant symbiotic fungi secondary metabolites .....</b>	<b>4</b>
<b>1.3 Research progress of Anoectochilus symbiotic fungus .....</b>	<b>5</b>
<b>1.4 Gene transcription control.....</b>	<b>7</b>
1.4.1 RNA polymerase.....	7
1.4.2 Cyclic phosphorylation of RNA Pol II .....	7
1.4.3 Positive transcriptional elongation factor b, P-TEFb.....	9
<b>1.5 Ca<sup>2+</sup> signaling and gene transcription regulation.....</b>	<b>10</b>
1.5.1 The intracellular calcium signal system.....	10
1.5.2 Calcineurin.....	11
1.5.3 Signal pathways related to calcium.....	12
<b>1.6 Cell apoptosis.....</b>	<b>13</b>
1.6.1 The characteristics and detection methods of cell apoptosis .....	13
1.6.2 The molecular mechanism of apoptosis.....	13
<b>1.7 The purpose and significance of this study .....</b>	<b>14</b>
<b>Chapter II Materials and methods.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1 Experimental materials .....</b>	<b>16</b>
2.1.1. Cell line, E.coli and Plasmids .....	16

2.1.2. Reagents .....	16
2.1.3. Apparatus .....	17
2.1.4. Solution .....	18
<b>2.2 Methods .....</b>	<b>24</b>
2.2.1. Cell culture .....	24
2.2.2 Drug treatment on J-LatA2 cell and Flow cytometry .....	25
2.2.3. Luciferase assay .....	26
2.2.4. PEI transient transfection .....	26
2.2.5. Preparation of whole cell lysis .....	27
2.2.6. Co-immunoprecipitation purification .....	28
2.2.7. Western blot (Western blot) .....	28
2.2.8.Total RNA extraction and reverse transcrip to cDNA (qRT-PCR) ...	29
2.2.9.Chromatin immunoprecipitation (CHIP) .....	31
2.2.10.Cell cycle detection.....	34
2.2.11.Annexin V-FITC/PI (Detection of apoptosis) .....	35
2.2.12. DNA transformation .....	35
2.2.13.Plasmid purification .....	36
<b>Chapter III Results and Discussion .....</b>	<b>37</b>
3.1. Screening HIV activators from symbiotic fungus secondary metabolites	37
3.2. ARL10-S8 reactivates of latent HIV virus in a time and dose manner ...	40
3.3. ARL10-S8 dissociates 7SK snRNP and promotes SEC formation .....	41
3.4. The reactivation of HIV virus by ARL10-S8 is associated with activation of calcium signaling.....	43
3.5.ARL10-S8 activates of calcineurin, inducing NFATs response to participate in the activation process of HIV virus .....	45
3.6. ARL10-S8 obtains anti tumor activity .....	47
3.7. ARL10-S8 can cause cell cycle arrest and induce cancer cell apoptosis by cytochrome C pathway .....	48
3.8. Discussion.....	49



<b>3.9. Conclusion .....</b>	<b>51</b>
<b>3.10. Prospect.....</b>	<b>51</b>
<b>References .....</b>	<b>53</b>
<b>Acknowledgement.....</b>	<b>60</b>

厦门大学博硕士论文摘要库

## 英文缩略词语对照表

Abbreviation	Full Name
7SK snRNP	7SK small nuclear ribonucleoprotein
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
Brd4	Bromodomain-containing protein 4
CDK9	Cyclin dependent kinase 9
CTD	C-terminal domain
DMEM	Dulbecco's modified of Eagle's medium
DRB	5,6-dichloro-1-b-D-ribofuranosyl-benzimidazole
HAART	Highly active antiretroviral therapy
HDAC	Histone deacetylase
HIV-1	Human immunodeficiency virus type 1
HMBA	Hexamethylene bisacetamide
LTR	Long terminal repeats
P-TEFb	Positive transcriptional elongation factor b
PKC	Protein kinase C
PP2B	Protein phosphatase 2B
RNA Pol II	RNA polymerase II

SEC Super elongation complex

TAR Trans-activation response

WHO World Health Organization

---

厦门大学博士论文摘要库

## 摘要

现行的艾滋病主要治疗手段是高效抗逆转录酶疗法，即俗称的鸡尾酒疗法，该疗法可以有效地抑制 HIV 病毒的复制，降低病人体内病毒颗粒的数量，有效延长病人生存期。但是鸡尾酒疗法并不能彻底清除病人体内的 HIV-1 病毒，同时还会产生耐药性，并伴随着较强的毒副作用，因此需要寻找新的治疗手段，彻底治愈艾滋病。“Shock and kill”疗法通过清除 HIV 病毒潜伏库的方式彻底治愈艾滋病，一经提出便受到国际间的广泛关注。

天然产物具有结构独特、生物活性广泛和不易耐药等特点，逐渐成为新药研发的热点。本实验室与厦门大学药学院天然产物中心合作，希望能够在植物共生真菌的次生代谢产物中筛选到低毒、有效的潜伏期 HIV 病毒激活剂，从而为“shock and kill”疗法提供前体药物。我们选用 J-Lat A2 细胞模拟 HIV-1 病毒在人体内的潜伏状态，在 18 株金线莲共生真菌的发酵产物中筛选潜在的激活剂。活性验证发现，金线莲共生真菌 ARL-10(暂命名)的发酵粗提物可以激活潜伏期 HIV 病毒。通过活性追踪实验的方法，最终得到活性单体物质 ARL10-S8(暂命名)，质谱检测到其分子量大小为 589.34g/mol，但由于物质本身的特点，纯化后的物质难以溶解，暂时无法通过核磁共振的方法得到其准确的化学结构等信息。初步的机理研究发现，ARL10-S8 引起钙离子内流，一方面引起了 7SK snRNP 复合物的解离，促进 SEC 复合物的组装，使得总 RNA Pol II 以及 RNA Pol II-CTD-Ser2 的在 HIV 基因组 Nascent RNA 区域结合增多，促进 HIV 基因组转录延伸过程；另一方面，钙离子内流激活钙调磷酸酶 CaN，引起下游的 NFATc2 蛋白响应，促进其入核并在 HIV 基因组的 Promoter 上富集，促进 HIV 基因转录起始过程。同时发现，ARL10-S8 具有抗肿瘤活性并通过细胞色素 C 途径引起细胞凋亡。

**关键词：**HIV 激活剂；7SK snRNP 解离；抗肿瘤活性

## Abstract

The current therapy of AIDS is HARRT (highly active antiretroviral treatment, HAART), which is also called cocktail therapy. It can effectively inhibit the replication of HIV virus, reduce the number of virus particles and prolong the survival time of patients. But the HARRT therapy cannot completely remove HIV-1 virus, leading to drug resistance and producing strong toxic side effects. It is necessary to find new treatments to cure AIDS completely. "Shock and Kill" therapy, which can cure AIDS through removing latent HIV virus reservoir, received considerable attention once being proposed.

Natural product with unique structure, biological activity and low drug resistance, has gradually become a hot topic in drug development. We cooperate with center of natural product in school of pharmacy, Xiamen University, hoping to find activators from secondary metabolites of plant symbiotic fungi with low toxicity, high efficiency, so as to provide a prodrug for therapy "shock and kill". We use J-Lat A2 cell as the screen model, which is a cell type stimulating HIV-1 virus in the human body in a latent state. We have screened fermentation products of 18 strains of endophytic fungus in *Anoectochilus roxburghii*, the results showed that *Anoectochilus* symbiosis fungus ARL-10 (temporarily named) fermentation extract can activate latent HIV virus. Finally we obtained the active monomer material ARL10-S8 (temporarily named), its molecular weight is 589.34g/mol through mass spectrometry, this monomer is difficult to dissolve, leading to the failure of getting exact chemical structure information by nuclear magnetic resonance. Preliminary research of mechanism reveal that ARL10-S8 can induce calcium flowing, which causes the dissociation of 7SK snRNP complexes and promotes the formation of SEC complexes, the total RNA Pol II and RNA Pol II-CTD-Ser2 were found to be enriched on HIV nascent RNA region, which boosts the process of HIV elongation. On the other hand, the

promotion of NFATs nuclear import and enrichment on HIV promoter caused by the activation of calcineurin CaN, increases the transcription activities of HIV initiation. We also find that ARL10-S8 has anti-tumor effect, and induces HeLa cells apoptosis by the way of cytochrome C pathway.

**Keywords:** HIV activators; 7SK snRNP dissociation; anti-tumor effect

厦门大学博硕士论文摘要库

## 第一章 前言

HIV 病毒全称为人类免疫缺陷病毒 (Human Immunodeficiency Virus, HIV)，感染后容易引起免疫缺陷。1981 年首例 AIDS 患者发现至今，由于缺乏显著有效地治疗手段和措施，导致其大量传播，威胁上千万患者健康。它不仅直接对感染者躯体健康及其家庭造成严重的危害，带来家庭贫困、孤儿增加、社会歧视等一系列问题，而且会影响到地区甚至国家的社会经济发展。因此，控制艾滋病已成为当前人类急需解决的重大问题之一。

### 1.1 艾滋病病毒介绍

#### 1.1.1 艾滋病病毒简介

1981 年，美国疾病预防控制中心首次报道了艾滋病病例。1982 年，这种疾病被命名为"艾滋病"。不久以后，艾滋病迅速蔓延到各大洲。截至 2013 年底，全球现存活艾滋病感染者高达 3500 多万人。HIV 病毒引起感染者机体抵抗力极度下降，甚至瓦解患者免疫系统，使其容易受到多种病原体的侵害，造成多种疾病，如真菌感染，肺炎，肾病等。

HIV 基因全长约 9.8kb，由 gag, pol, env, tat, rev 和 nef, vpr, vpu, vif 蛋白组成的病毒颗粒<sup>[2-9]</sup>。多年来，对于 HIV 病毒的来源一直分歧众多，2015 年欧洲科学家最终发现 HIV 病毒的源头来自喀麦隆的黑猩猩<sup>[10]</sup>，人类终于确定了艾滋病毒的源头。

HIV 变异性很强，其原因可能有以下几个方面<sup>[11-13]</sup>：1 逆转录酶错误率高，复制过程中，无法及时切除错误插入的核苷酸。2 病毒复制频率高，艾滋病患者平均每天要产生 100 亿个病毒颗粒，造成错误机率增加。3 不同病毒株 DNA 之间的基因重组。

#### 1.1.2 艾滋病的致病机理

HIV 导致人体的 T 淋巴细胞大量消亡, 导致免疫系统功能性瘫痪<sup>[14]</sup>。由于 HIV 的变异极其迅速, 难以生产特异性疫苗<sup>[15]</sup>。艾滋病由于其传染的危害性, 被列为国境卫生监测传染病之一, 我国卫生部门将其列入乙类传染病。

艾滋病毒感染的的第一步, 是病毒蛋白颗粒与 T 淋巴细胞上的膜受体结合, 即病毒蛋白 gp120 与 T 细胞表面的 CD4 受体以及共受体 CCR5 或 CXCR4 结合<sup>[16]</sup>。起初, 研究人员普遍认为与 HIV 病毒糖蛋白的结合只需要 CD4 受体参与, 但经过多年研究, 科学家发现艾滋病毒侵染 T 细胞, 不仅需要 CD4 受体, 其共受体也是必不可少的, 并最终发现了这个共受体 CCR5<sup>[17]</sup>。我国中科院上海药物研究所吴蓓丽研究员解析了 CCR5 的三维立体结构, CCR5 是一种受体蛋白质, 位于细胞表面, 在艾滋病毒感染人体免疫细胞时发挥重要作用。

多数研究认为, 病毒侵染人体后, 宿主细胞免疫系统可以识别被感染的细胞和病毒, 并将其大量清除。HIV 病毒最先感染的是处于活化状态的 CD4<sup>+</sup>T 细胞, HIV 病毒侵入宿主细胞后, 利用自身的逆转录酶将基因组 RNA 逆转录为 DNA, 并插入到人体正常基因组序列中, 从而将病毒基因组整合到人染色体中, 结果造成 HIV 基因组成为人体基因组的一部分, 伴随着人体正常基因进行复制和转录。HIV 病毒将感染后的 CD4<sup>+</sup>T 细胞转化为静息细胞 (resting CD4<sup>+</sup>T cell), 使细胞周期停滞在 G0 期, 细胞的复制和转录水平极低, 没有病毒蛋白质和新病毒颗粒的产生, 因此无法被免疫系统查杀, 从而长久潜伏下来, 这就是 HIV 病毒潜伏库产生的过程。HIV 病毒潜伏库可以长久生存, 半衰期为 4 周, 一旦受到外界刺激或者体内环境影响, HIV 病毒潜伏库又可以被重新激活, 快速进入转录活跃期, 产生新的病毒蛋白, 与病毒 RNA 一起包装成新的病毒颗粒。

### 1.1.3 艾滋病 HAART 疗法

高效抗逆转录病毒疗法<sup>[18]</sup> (Highly Active Antiretroviral Therapy, HAART) 是目前国际上最为常用的艾滋病治疗方法。HIV 复制<sup>[19]</sup>过程的重要环节可概括为: HIV 对宿主细胞的吸附、HIV 与宿主细胞的融合、病毒 RNA 的逆转录、病毒 DNA 的整合、DNA 的转录、病毒蛋白质的表达、组装以及病毒粒



Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.